

响应面法优化养殖水体中炔雌醇的固相萃取条件

沈路遥, 彭自然*, 何文辉

(上海海洋大学, 海洋生态与环境学院, 上海 201306)

摘要:在单因素试验、Plackett-Burman 设计试验基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法对养殖水体中炔雌醇 (EE2) 的固相萃取条件进行优化。结果表明, 洗脱液体积、洗脱液组成和淋洗液体积是影响 EE2 固相萃取回收率的 3 个主要因素; EE2 的最佳固相萃取条件为: 水样 pH 值为 3, 进样流量为 3.0 mL/min, 淋洗液为体积分数为 10% 的甲醇水溶液, 淋洗液体积 7.0 mL, 洗脱液为乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (体积比为 9:1), 洗脱液体积 12.0 mL。该条件下养殖水样中 EE2 固相萃取回收率为 81.6% ~ 86.7%。

关键词: 炔雌醇; 固相萃取; 响应面法; 养殖水体

中图分类号: O652.6

文献标志码: B

文章编号: 1006-2009(2020)03-0048-04

Optimization of Solid-phase Extraction Conditions for Ethinylestradiol in Aquaculture Water by Response Surface Method

SHEN Lu-yao, PENG Zi-ran*, HE Wen-hui

(College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: On the basis of single factor experiment and Plackett-Burman design, the solid phase extraction conditions for ethinylestradiol (EE2) in aquaculture water were optimized by response surface method (Box-Behnken Design). The results showed that the volume and composition of the eluant, the volume of the leachate were the three main factors affecting the recoveries of EE2 extraction. The optimum conditions of SPE were as follows: pH value of water sample was 3, the injection flow rate was 3.0 mL/min, the leachate was methanol solution of 10% volume fraction, the leachate volume was 7.0 mL, the eluent was ethyl acetate-*n*-hexane mixed solution (volume ratio 9:1), the eluent volume was 12.0 mL. Under these conditions, the recoveries of EE2 in aquaculture water samples were 81.6% ~ 86.7%.

Key words: Ethinylestradiol; Solid phase extraction; Response surface methodology; Aquaculture water

炔雌醇 (EE2) 是一种人工合成雌激素, 具有较强的雌激素生物活性^[1], 研究表明, EE2 可干扰生物体正常内分泌机能, 导致鱼类生殖功能异常, 妇女乳腺癌、子宫癌发病率及男性不育率增高^[2-3]。水产养殖环境中 EE2 残留对水产品及人类健康具有潜在危害, 需要对养殖水体中 EE2 的存在水平进行监测。样品前处理是决定分析检测结果准确性的关键步骤。固相萃取技术在水环境有机污染物分析领域应用广泛^[4]。

目前, 固相萃取方法的建立多采用单因素实验、正交试验^[5]等。响应面法作为一种优化试验设计, 近年来在食品、药品、工程等^[6-8]领域应用较

广, 其对数据的统计分析要优于正交试验。Plackett-Burman 设计可通过比较各因子两水平之间的差异来确定因子的显著性, 是较为常用的因子筛选方法^[9]。

今采用单因素试验、Plackett-Burman 设计 (以下简称 P-B 设计) 和 Box-Behnken 响应面法

收稿日期: 2019-05-15; 修订日期: 2020-04-30

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项基金资助项目 (2017ZX07205-003-R07)

作者简介: 沈路遥 (1995—), 女, 上海人, 在读研究生, 研究方向为环境有机污染物检测技术。

* 通信作者: 彭自然 E-mail: zrpeng@shou.edu.cn

对固相萃取条件进行探究,以期通过优化方法提高养殖水体中 EE2 的固相萃取回收率。

1 试验

1.1 主要试剂与仪器

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪,具紫外检测器;Inertsil ODS-3(5 μm ,4.6 mm $\times$ 250 mm)色谱柱;Visiprep DL SPE 固相萃取装置;kcp-c 蠕动泵;Oasis HLB(6 mL,500 mg)固相萃取柱;PHBJ-260 型 pH 计;QYN100-2 型氮吹仪;KQ-300DE 型超声波清洗器;SAS 9.4 统计分析软件。

呋喃酮标准品(纯度 99.5%),中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、乙酸乙酯、正己烷、甲酸(色谱纯),氨水(分析纯)。准确称取已干燥的 EE2 标准品 100.0 mg,用甲醇溶解并定容至 100 mL,配制成 1 000 mg/L 的标准储备液,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。临用前,准确移取 1.00 mL 标准储备液于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释成 10.00 mg/L 的标准使用液。

1.2 样品前处理

配制 EE2 为 5.00 $\mu\text{g/L}$ 的超纯水或养殖水加标水样,养殖水加标前经 0.45 μm 玻璃纤维滤膜过滤。分别用 6 mL 甲醇,6 mL 超纯水活化固相萃取柱,取 1 L 加标水样调节 pH 值后以一定流量通过固相萃取柱,经淋洗、干燥、洗脱、氮吹等步骤后收集管内物质,用甲醇溶解并转移至进样瓶中,定容至 1.00 mL,经 0.22 μm 玻璃纤维滤膜过滤后待测。

1.3 液相色谱条件

采用 Inertsil ODS-3 型色谱柱,柱温 20 $^{\circ}\text{C}$,紫外检测器波长 210 nm,流动相为乙腈-水混合溶液(体积比为 1:1),流量 1.0 mL/min,进样体积为 10 μL 。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

将标准使用液用甲醇配制成 0.05 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L、3.00 mg/L、5.00 mg/L、8.00 mg/L 的标准系列,在 1.3 条件下测定。以质量浓度为横坐标,对应的峰面积响应值为纵坐标绘制标准曲线。结果 EE2 在该范围内线性关系良好,相关系数为 0.999 8。

2.2 单因素试验结果与分析

EE2 加标量均为 5.00 $\mu\text{g/L}$,设 3 组平行。各因素的水平选取已进行单因素试验所得回收率较高的水平进行。首先对水样 pH 值进行研究,用甲酸溶液和氨水调节水样 pH 值,以 3.0 mL/min 的恒定流量过柱,上样完毕用 5.0 mL 超纯水淋洗,弃去水样及淋洗液,用真空泵将小柱抽干,用 10.0 mL 乙酸乙酯洗脱目标物。

分别考察超纯水加标样 pH 值为 3、5、7、9 时 EE2 的回收率。结果当 pH 值为 3 时回收率较高,且随着 pH 值的增大,回收率逐渐降低。继续考察养殖水加标样 pH 值在 2、3、5 时的回收率,结果当 pH 值为 3 时 EE2 的回收率较高,pH 值为 2 时 EE2 的回收率有所降低,可能是由于水样酸性的增加使水中腐殖酸等有机干扰物质的质子化程度提高,溶解度和亲水性降低,易于被固相萃取填料吸附,干扰了 EE2 的回收^[10]。养殖水加标样受基质干扰,EE2 的回收率普遍低于超纯水加标样,故需进一步优化固相萃取条件以提高 EE2 的回收率。

分别考察当进样流量为 3.0 mL/min、6.0 mL/min、9.0 mL/min、12.0 mL/min 时 EE2 的回收率。结果表明,回收率随进样流量的增加而降低,进样流量控制在 3.0 mL/min 较适宜,用甲醇调节淋洗液洗脱强度。

试验表明:当淋洗液为纯水时,养殖水中 EE2 的回收率较低,使用体积分数为 5% 的甲醇水溶液后,EE2 的回收率有所上升;当淋洗液中甲醇体积分数为 10% 时,EE2 的回收率达到最高;当淋洗液是体积分数为 20% 的甲醇水溶液时,EE2 的回收率有所下降,可能是在该洗脱强度下吸附在固相萃取填料上的 EE2 被部分洗脱。用体积分数为 10% 的甲醇水溶液作淋洗液,分别考察淋洗液体积为 3.0 mL、5.0 mL、7.0 mL、9.0 mL 时的回收率,结果表明当淋洗液体积为 7.0 mL 时养殖水中 EE2 的回收率较高。

洗脱溶剂的选择以其洗脱液强度能刚好洗脱目标化合物为佳,当洗脱液体积为 10 mL 时,分别考察不同洗脱溶剂对养殖水中 EE2 固相萃取回收率的影响。

试验表明,乙酸乙酯和丙酮对 EE2 的洗脱效果要优于甲醇和乙腈,此外,乙酸乙酯对色素的洗脱能力较弱,氮吹时较易挥发,有利于富集和净化。为进一步优化洗脱强度,试验采用乙酸乙酯-正己烷^[11]作为洗脱液。结果表明,EE2 的回收率随洗

脱液中乙酸乙酯体积分数的增大而升高,当洗脱液为 100% 乙酸乙酯时,EE2 的回收率最高。从杂质去除方面看,使用正己烷降低洗脱液强度后,杂质峰的面积随着洗脱液中正己烷体积分数的增加而减小。用乙酸乙酯作为洗脱液绘制洗脱曲线,结果表明,当洗脱液流出体积为 10 mL 时,继续增加洗脱液体积,EE2 回收率增长不明显。

2.3 P-B 设计试验结果与分析

在单因素实验的基础上,选用试验次数 $N=12$ 的 P-B 试验设计,以 EE2 固相萃取回收率(Y)为响应值,对单因素试验中的 6 个因素进行考察。P-B

B 设计试验结果见表 1,其中设 5 个虚拟列(E、H、I、J、K),以考察误差。经多元回归分析和方差分析,P-B 设计试验的因素在所取水平范围内对 EE2 固相萃取回收率的影响显著($P=0.0185$),决定系数为 0.9062,回归有效。其中洗脱液体积对 EE2 固相萃取回收率有极显著影响($P=0.0017$),洗脱液组成(乙酸乙酯-正己烷)对回收率有显著影响($P=0.0327$)。水样 pH 值、进样速度、淋洗液(甲醇-水)、淋洗液体积对回收率的影响不显著, P 值分别为 0.9959、0.8728、0.4111 和 0.2875。

表 1 P-B 设计试验结果
Table 1 Experimental results of P-B design

编号	A 水样 pH 值	B 进样流量 q_V / ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	C 淋洗液甲醇 体积分数 $\varphi/\%$	D 淋洗液体积 V/mL	F 洗脱液乙酸 乙酯体积分数 $\varphi/\%$	G 洗脱液体积 V/mL	E	H	I	J	K	Y 回收 率/ $\%$
1	3	2.0	10	5.0	80	12.0	-1	1	1	-1	1	81.4
2	3	3.0	5	9.0	80	8.0	-1	1	1	1	-1	57.8
3	2	3.0	10	5.0	80	8.0	1	-1	1	1	1	61.4
4	3	2.0	10	9.0	100	8.0	-1	-1	-1	1	1	73.8
5	3	3.0	5	9.0	80	12.0	1	-1	-1	-1	1	81.4
6	3	3.0	10	5.0	100	8.0	1	1	-1	-1	-1	67.9
7	2	3.0	10	9.0	100	12.0	-1	-1	1	-1	-1	84.7
8	2	2.0	10	9.0	80	12.0	1	1	-1	1	-1	82.5
9	2	2.0	5	9.0	100	8.0	1	1	1	-1	1	74.2
10	3	2.0	5	5.0	100	12.0	1	-1	1	1	-1	81.1
11	2	3.0	5	5.0	100	12.0	-1	1	-1	1	1	88.7
12	2	2.0	5	5.0	80	8.0	-1	-1	-1	-1	-1	52.0

2.4 Box-Behnken 设计试验结果与分析

选取淋洗液体积(X_1)、洗脱液(X_2)、洗脱液体积(X_3)为自变量,EE2 固相萃取回收率(Y)为响应值进行 Box-Behnken 响应面分析。其他固相萃取条件采用单因素试验所得最佳条件:水样 pH 值为 3,进样流量为 3.0 mL/min,淋洗液为体积分数为 10% 的甲醇水溶液。Box-Behnken 设计试验及结果见表 2。

对表 2 中数据进行多元回归拟合,得到 EE2 固相萃取回收率(Y)与淋洗液体积(X_1)、洗脱液(X_2)、洗脱液体积(X_3)的三元二次多项式回归模型:

$$Y = -1214 + 13.28X_1 + 18.53X_2 + 69.52X_3 - 0.706X_1^2 + 0.031X_1X_2 - 0.068X_2^2 - 0.5X_3X_1 - 0.544X_3X_2 - 0.594X_3^2$$

该回归模型一次项 X_2 、 X_3 和交互项 $X_3 \times X_2$ 的

表 2 Box-Behnken 设计试验结果

Table 2 Experimental results of Box-Behnken design

编号	X_1/mL	$X_2/\%$	X_3/mL	$Y/\%$
1	5.0	80	10.0	70.3
2	5.0	100	10.0	91.1
3	9.0	80	10.0	72.6
4	9.0	100	10.0	95.9
5	7.0	80	8.0	48.9
6	7.0	80	10.0	96.0
7	7.0	100	8.0	91.6
8	7.0	100	12.0	95.2
9	5.0	90	8.0	73.7
10	9.0	90	8.0	83.8
11	5.0	90	12.0	94.0
12	9.0	90	12.0	96.1
13	7.0	90	10.0	89.3
14	7.0	90	10.0	94.4
15	7.0	90	10.0	92.6

系数极显著,二次项 $X_2 \times X_2$ 的系数显著。线性项、交叉项和平方项的决定系数分别为 0.710 3、0.189 6 和 0.077 7,表明该响应面回归主要是线性关系。总模型的 P 值和决定系数分别为 0.001 3 和 0.977 5,说明模型极显著且具有较高的拟合精度,回归有效。响应面模型失拟检验表明,模型失拟项不显著 ($P = 0.324\ 3$)。

响应面典型分析表明所得响应面的驻点为鞍点,采用岭脊分析^[6]确定试验最佳处理,结果见表 3。

由表 3 可知,当搜索半径为 1 时 EE2 固相萃取回收率的估计响应值为 100,其岭脊点坐标为 $X_1 = 7.07, X_2 = 89.95, X_3 = 12.00$ 。由此预测 EE2 固相

萃取回收率的最佳处理为淋洗液体积 7.07 mL、洗脱液(乙酸乙酯-正己烷)乙酸乙酯的体积分数为 89.95%、洗脱液体积 12.00 mL。

2.5 方法效能验证

在响应面岭脊分析基础上,结合实际操作需要,确定优化后淋洗液体积为 7.0 mL、洗脱液为乙酸乙酯-正己烷(体积比为 9:1)、洗脱液体积为 12.0 mL,其他固相萃取条件采用单因素试验所得最佳条件。为验证优化方法,对养殖水样做加标回收试验。试验表明,EE2 在 0.50 μg/L、1.00 μg/L、5.00 μg/L 3 个质量浓度水平下的加标回收率为 81.6% ~ 86.7%,与优化前相比有 10% 左右的提高,达到了优化效果。

表 3 响应面最大岭脊分析结果

Table 3 Ridge analysis results by maximum response surface

编码半径	估计响应	标准误差	X_1	X_2	X_3
0	92.1	1.97	7.00	90.00	10.00
0.1	93.5	1.96	7.03	90.69	10.14
0.2	94.7	1.95	7.07	91.32	10.29
0.3	95.8	1.92	7.11	91.84	10.46
0.4	96.6	1.89	7.15	92.20	10.65
0.5	97.3	1.85	7.18	92.28	10.87
0.6	97.9	1.84	7.19	92.06	11.11
0.7	98.5	1.84	7.17	91.61	11.35
0.8	99.0	1.89	7.15	91.10	11.58
0.9	99.6	1.99	7.11	90.52	11.79
1	100	2.15	7.07	89.95	12.00

3 结语

经单因素实验、P-B 设计试验和 Box-Behnken 响应面法得到养殖水体中 EE2 的最佳固相萃取条件:水样 pH 值为 3,进样流量为 3.0 mL/min,淋洗液为体积分数为 10% 的甲醇水溶液,淋洗液体积 7.0 mL,洗脱液为乙酸乙酯-正己烷混合溶液(体积比为 9:1),洗脱液体积 12.0 mL。该条件下养殖水样中 EE2 固相萃取回收率为 81.6% ~ 86.7%。响应面法可用于固相萃取条件的优化,对提高水样中目标物的固相萃取回收率有一定的意义。

[参考文献]

[1] 隋倩,黄俊,余刚.中国城市污水处理厂内分泌干扰物控制优先性分析[J].环境科学,2009,30(2):384-390.
[2] MUHAMMAD M,SONG X M,WANG Y Y,et al.Environmental impact of estrogens on human,animal and plant life:A critical review[J].Environment International,2017,99:107-119.
[3] 庄太凤,韩建,刘丽玉,等.孕激素醋酸甲地孕酮和雌激素乙

呋喃酮复合暴露对斑马鱼的生殖毒性[J].环境化学,2017,36(7):1440-1450.
[4] 李贝,张杰,王琪,等.固相萃取-气相色谱法测定水中酞酸酯类化合物[J].环境监测管理和技术,2017,29(6):46-49.
[5] 谭丽超.水环境中类固醇激素的污染特征及健康风险评估研究[D].南京:南京农业大学,2011.
[6] 付丽红,李晓斌.基于岭脊分析的藜麦淀粉提取及糊化特性研究[J].农业工程学报,2016,32(18):299-306.
[7] 陈林伟,秦昆明,王琴,等.Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺[J].中草药,2015,46(8):1151-1155.
[8] 谈玄玄,李小敏.亚麻对染料甲基紫吸附的响应面法分析[J].环境监测管理和技术,2017,29(6):68-71.
[9] 王玉顺.试验设计与统计分析 SAS 实践教程[M].西安:西安电子科技大学出版社,2012:227-233.
[10] 钱玉山,王瑛,龚云峰.混凝 pH 对水中溶解态有机物去除影响研究[J].能源环境保护,2009,23(1):38-40.
[11] 赖宇红,陈浩松.固相萃取法在中药分析中的应用前景及其建立优化新方法的策略与步骤[J].广东药学,2002(2):12-16.